



Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*

Sri Wahyu Murni, Siti Diyar Kholisoh, Tanti D.L., dan Petrissia E.M.

Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, UPN "Veteran" Yogyakarta
Jl. SWK 104 (Lingkar Utara), Condong Catur, Yogyakarta 55283, Telp./Fax. +62-274-486889
E-mail: wahyuswm@yahoo.com, diyar.kholisoh@upnyk.ac.id

Abstract

*Lipase has a great potential in oil and fat industries due to its ability to perform hydrolytic activities at low temperature and pressure conditions. A number of factors influence the production and activity of enzymes. This study was aimed to produce and characterize lipase from *Aspergillus niger*, and therefore isolate it, as well. The lipase enzyme was produced through a batch fermentation process in a 1.4 liters-fermentor. Fermentation was carried out at room temperature, initial pH of 7, the stirring speed of 250 rpm, aeration rate of 1 vvm, and inducer concentration of 3%-g palm oil/ml. Produced enzymes were therefore characterized at several temperature and pH variations. The investigation concluded that the enzyme lipase showed the optimum performance at pH of 7 and temperature of 30 °C. Under these conditions, the enzyme had an activity of 1.5 U / ml. Isolation process of lipase by using 90% ammonium sulfate yielded a 4-times-increase in its activity.*

Keywords: *Aspergillus niger*, characterization, enzyme activity, isolation, lipase

Pendahuluan

Enzim merupakan produk yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan telah menjadi alat praktis yang penting karena sangat diperlukan untuk menunjang berbagai proses dalam industri pangan maupun non pangan (Darwis dan Sukara, 1990). Contoh pemanfaatan enzim yaitu pada proses industri untuk hidrolisis lemak/minyak menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak dan gliserol merupakan produk oleokimia dasar yang sangat diperlukan oleh industri kosmetik, plastik, cat, deterjen, dan sabun. Dewasa ini proses tersebut beroperasi pada suhu 240 – 250 °C dan tekanan 45 – 50 atm. Pada proses ini diperlukan energi yang cukup besar untuk mempertahankan kondisi operasinya dan juga asam lemak yang dihasilkan umumnya berwarna coklat yang akan mengakibatkan rusaknya komponen-komponen minor yang terkandung di dalam minyak, misalnya β -karoten. (Herawan dan Nuryanto, 1996). Pada kondisi operasi tersebut, campuran reaksi bersifat korosif, yang mengakibatkan kebutuhan investasi untuk peralatan relatif besar, karena selain harus tahan terhadap suhu dan tekanan tinggi peralatan harus dibuat dari bahan yang tahan korosi. Didasarkan pada hal-hal tersebut, maka perlu dicari alternatif proses lain yang lebih baik.

Proses hidrolisis enzimatik dengan menggunakan enzim lipase dapat memenuhi kriteria tersebut, karena proses ini beroperasi pada suhu yang relatif rendah antara 30 – 60 °C dan tekanan atmosferik, sehingga aman bagi lingkungan kerja

dan tidak memerlukan energi yang cukup besar. Di samping itu, produk yang dihasilkan mempunyai kualitas yang relatif lebih baik dibandingkan produk sejenis yang dibuat dengan proses kimia/fisika, karena relatif tidak terjadi kerusakan akibat pemanasan pada suhu tinggi. Dengan melihat banyaknya kegunaan atau manfaat dari enzim lipase di atas, maka enzim lipase layak untuk diproduksi dan memiliki peluang yang cukup besar untuk digunakan dalam proses hidrolisis minyak nabati di Indonesia.

Sebagai biokatalis, enzim memiliki sifat-sifat yang unik, yaitu antara lain dapat aktif dalam jumlah yang sangat kecil dan aksi katalitiknya spesifik. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan produksi dan karakterisasi enzim lipase dari *Aspergillus niger* dengan induser minyak goreng sawit, serta isolasinya. Karakterisasi bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum kinerja enzim, sedangkan isolasi enzim bertujuan untuk memperoleh enzim dengan aktivitas tinggi.

Enzim Lipase. Lipase (EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang memiliki peran penting dalam bioteknologi modern. Lipase terkenal memiliki aktivitas yang tinggi dalam reaksi hidrolisis dan dalam kimia sintesis. Lipase dapat berperan sebagai biokatalis untuk reaksi-reaksi hidrolisis, esterifikasi, alkoholisis, asidolisis, dan aminolisis (Gandhi, 1997).

Lipase menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas, gliserida parsial, dan gliserol. Trigliserida sebagai substrat terdiri dari asam lemak

rantai panjang yang tidak larut dalam air. (Shahani, 1975) Lipase menghidrolisis ikatan ester pada permukaan antara fase cair, dimana enzim terlarut dan fasa substrat tidak terlarut.

Lipase biasanya diproduksi oleh pankreas babi dan sapi, ragi *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, dan *Mucor sp.* Dalam industri, lipase antara lain digunakan dalam industri farmasi dan untuk menghasilkan asam lemak dari minyak tidak stabil yang biasanya mengandung asam lemak tidak jenuh. Lipase dari *Candida cylindracea* digunakan untuk menghidrolisis minyak dalam pembuatan sabun. Selain bidang farmasi, lipase juga digunakan dalam industri kosmetik, kulit, makanan, parfum, dan sintesis bahan organik lain. (Ghandi, 1997)

Fungsi dan Cara Kerja Enzim. Fungsi suatu enzim adalah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Jadi enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien, di samping itu mempunyai derajat kekhasan yang tinggi. (Poedjiadi, 1994)

Enzim berfungsi sebagai katalis untuk mempercepat atau meningkatkan kecepatan reaksi kimia dengan jalan menurunkan energi aktivasinya. Di sisi lain, untuk meningkatkan kecepatan reaksi kimia dapat juga dilakukan dengan meningkatkan suhu reaksi. Suhu yang tinggi dapat mempercepat gerak molekul. Namun demikian, penggunaan suhu tidak selamanya baik dan tepat, karena tidak semua senyawa (reaktan) dapat tahan terhadap suhu yang tinggi. Selain dapat merusak reaktan, penggunaan suhu tinggi juga mengakibatkan biaya proses yang lebih besar. (Lehninger, 1990)

Enzim mempunyai kekhasan yaitu hanya bekerja pada satu reaksi saja. Suatu enzim mempunyai ukuran yang lebih besar daripada substratnya. Oleh karena itu tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat, bagian enzim yang mengadakan hubungan dengan substrat disebut bagian aktif. (Poedjiadi, 1994)

Fermentasi Produksi Enzim. Dalam proses produksi enzim dengan menggunakan mikroorganisme, tahap-tahap yang perlu diperhatikan meliputi pemilihan *strain* dan pengaturan kondisi proses. Strain yang dipilih dalam penelitian ini adalah *Aspergillus niger*. Hal ini dikarenakan *A. niger* merupakan jenis mikroba yang memiliki keunggulan, yaitu menghasilkan enzim ekstraseluler dengan aktivitas tinggi serta mudah dalam pemeliharaannya. Selain itu, secara ekonomi mikroba tersebut harus mudah didapat dengan harga yang murah, dan mampu berkembang pada media yang biayanya relatif murah serta ketersediaannya mudah didapatkan.

Pengaturan kondisi proses meliputi hal-hal sebagai berikut:

Komposisi Media. Komposisi media yang dipilih harus cukup untuk memenuhi kebutuhan nutrisi yang berfungsi sebagai sumber makanan bagi mikroorganisme. Nutrisi tersebut terdiri dari C, N, P, S, Fe, dan Mg serta vitamin. Mikroba dibiakkan dalam campuran minyak 1%, sukrosa (gula pasir) 1%, NH_4NO_3 0,1%, KH_2PO_4 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%. Menurut Stanbury dan Whittaker (1984), enzim hanya dapat diproduksi bila ada senyawa yang menginduksinya.

Induser dan Represor. Induser merupakan suatu zat yang mampu memacu kerja mikroorganisme untuk menghasilkan suatu enzim tertentu. Untuk memproduksi enzim lipase biasanya digunakan induser yang berhubungan dengan minyak, lemak, atau asam lemak, seperti minyak sawit. Represor pada produksi enzim lipase berupa sumber karbon sederhana, yaitu mono dan disakarida. Jika hanya terdapat substrat glukosa maka enzim lipase tidak disintesis (Benjamin & Pandey, 1996).

pH dan Suhu. Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh pH, dan biasanya pH optimum pertumbuhan sel berbeda dengan pH optimum aktivitas enzim. Pada umumnya pH optimum untuk beberapa enzim adalah sekitar larutan netral atau asam lemah (Tambun, 2002). Reaksi-reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh suhu. Suhu dapat menentukan aktivitas maksimum dari enzim. Suhu optimum tergantung pula pada jenis enzim, susunan cairan, dan lamanya percobaan.

Aerasi dan Pengadukan. *A. niger* bersifat aerobik. Aerasi berfungsi memasok oksigen untuk pertumbuhan sel, sedangkan pengadukan berperan agar campuran fermentasi menjadi homogen. Pada penelitian terdahulu, Sri Wahyu Murni dkk (2010) telah melakukan optimasi terhadap kondisi proses fermentasi produksi enzim lipase oleh *A. niger*. Kondisi optimum yang diperoleh pada 1,4 liter volume fermentasi meliputi: konsentrasi induser 3 g/ 100 ml media (atau 3 %-g/ml), laju aerasi 1 vvm, dan laju putaran pengadukan 250 rpm.

Kinetika Pertumbuhan Sel dan Pembentukan Produk. Pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme dapat ditandai dengan semakin bertambahnya berat sel dan semakin bertambahnya jumlah sel itu. Hal ini dapat tercapai jika faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme, seperti suhu, pH, dan nutrisi yang diperlukan terpenuhi. Secara umum, kurva pertumbuhan mikroorganisme terdiri dari tiga fase utama, yaitu fase *lag*, fase eksponensial, dan fase stasioner. Kinetika pertumbuhan sel dan pembentukan produk sangat berkaitan. Hal ini dipengaruhi oleh fungsi produk tersebut di dalam proses metabolisme sel. Penggambaran sintesis

produk dalam masa pertumbuhan (*growth-associated*) dan setelah pertumbuhan sel terhenti (*nongrowth-associated*) merupakan dua bentuk kinetika yang umum. Bentuk yang kurang umum adalah pola *mixed-growth-associated*, di mana pada awal pertumbuhan sel produk tidak terbentuk, tetapi pada beberapa saat kemudian produk mulai dihasilkan sedangkan pertumbuhan sel berjalan terus. (Wang dkk., 1979)

Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kinerja Enzim. Kinerja enzim dalam menghidrolisis minyak sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pH, dan keberadaan inhibitor. Jika faktor-faktor tersebut dioptimasi, maka enzim dapat menghasilkan kinerja optimum yang ditunjukkan dengan tingginya nilai aktivitas enzim tersebut.

Konsentrasi Enzim. Seperti pada katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Dengan kata lain, semakin tinggi konsentrasi enzimnya maka semakin besar pula aktivitas enzim tersebut. (Poedjiadi, 1994)

Konsentrasi Substrat. Poedjiadi (1994) menyatakan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka pertambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Hal ini dikarenakan, untuk dapat membentuk kompleks enzim-substrat diperlukan adanya kontak antara enzim dengan substrat.

Suhu dan pH. Seperti protein lainnya, enzim dapat terdenaturasi pada suhu tertentu, perilaku kimia, dan kondisi ekstrim lainnya. Konsekuensinya pemanfaatan enzim terbatas pada rentang suhu dan pH tertentu. Karena enzim merupakan suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan menurun.

Struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda. Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Di samping pH berpengaruh pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Pada suatu pH tertentu atau daerah pH yang dapat menyebabkan kecepatan reaksi paling tinggi, maka pH tersebut dinamakan pH optimum. (Poedjiadi,

1994). Menurut Christakopoulos (1992), lipase yang dihasilkan oleh *Calvatia gigantea* dapat mencapai aktivitas tertingginya pada suhu 30°C dan pH 7. Sedangkan menurut penelitian Sharon dkk. (1998), lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* memiliki aktivitas maksimum pada pH 8,5 dan suhu 30°C. Hal tersebut memperlihatkan bahwa kondisi optimum suhu dan pH dipengaruhi oleh jenis mikroba yang digunakan.

Pengaruh Inhibitor. Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor. Molekul inhibitor dapat berupa modifikasi gugus fungsi pada molekul enzim, molekul yang mirip dengan substrat. Inhibitor dapat mengurangi peluang bagi terbentuknya kompleks enzim substrat dan hal ini menyebabkan berkurangnya kecepatan reaksi. (Poedjiadi, 1994)

Isolasi Enzim. Isolasi enzim bertujuan memekatkan enzim hasil fermentasi. Proses ekstraksi enzim dapat dijalankan melalui 4 langkah proses, yaitu: (1) menghilangkan bahan-bahan terlarut dari bahan baku, (2) mengisolasi produk dari larutan encer yang dihasilkan untuk menghasilkan lebih larutan pekat, (3) memurnikan produk, menghilangkan spesies lain yang mungkin mirip, dan (4) pemurnian akhir, yang disebut dengan *polishing*. Proses pemekatan enzim lipase dapat dilakukan dengan metode pengendapan protein melalui penambahan garam mineral. Metode ini merupakan bagian dari proses isolasi dengan metode ekstraksi. Metode ekstraksi digunakan untuk memisahkan enzim (protein) yang terkandung dalam larutan dengan menggunakan garam mineral, sehingga enzim yang merupakan fraksi berat akan terendapkan di bawah.

Dalam pemilihan jenis garam mineral tersebut terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan, yaitu (Belter dkk, 1988): (1) Anion yang efektif dalam urutan sebagai berikut: $\text{citrate} > \text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$. (2) Kation efektif dalam urutan sebagai berikut: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$. (3) Dipilih garam yang murah, jika akan digunakan dalam jumlah yang banyak. (4) Dipilih garam yang densitasnya berbeda dari densitas larutan, sehingga dapat dilakukan pemisahan dengan proses sentrifugasi

Amonium sulfat merupakan garam mineral yang paling umum digunakan dalam proses pengendapan enzim, karena solubilitasnya di dalam air amat tinggi, tidak mengandung zat-zat yang toksik terhadap kebanyakan enzim, harganya relatif murah, dan dalam jumlah banyak dapat bertindak sebagai stabilisator enzim itu sendiri. (Darwis dan Sukara, 1990).

Enzim lipase yang dihasilkan dalam bentuk cair harus dipekatkan terlebih dahulu untuk mendapatkan ekstrak enzim yang lebih pekat. Dengan pemekatan, aktivitas enzim akan meningkat sampai beberapa kali lipat dari aktivitasnya pada

keadaan encer. Pemekatan enzim encer yang dilakukan oleh Christakopoulos (1992) dengan menggunakan amonium sulfat pada kejenuhan 90% memperlihatkan bahwa dari 50 ml enzim encer dapat menghasilkan 5 ml enzim pekat, dengan kenaikan aktivitas enzim dari 4,2 U/ml sebelum dipekatkan menjadi 36,8 U/ml setelah dipekatkan.

Metodologi

Penelitian ini dilakukan melalui tahap-tahap: (1) penyiapan bahan dan alat, (2) penyediaan biakan murni jamur *Aspergillus niger* dalam media agar miring, (3) penyediaan biakan dalam media *starter*, (4) percobaan pendahuluan untuk memperoleh waktu optimum inokulasi jamur di dalam media *starter*, (5) fermentasi untuk memproduksi enzim lipase, karakterisasi enzim lipase dalam berbagai variasi suhu dan pH, serta (6) isolasi enzim lipase menggunakan metode *salting out* dengan garam amonium sulfat dari cairan hasil fermentasi.

Bahan. Bahan yang digunakan meliputi: (1) biakan jamur *Aspergillus niger* FNCC 0060 dalam media agar miring yang diperoleh dari PAU Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta, (2) minyak goreng sawit, dengan merk dagang Kunci Mas, sebagai induser, (3) media agar miring, dengan komposisi per 100 ml: taoge 10 g, glukosa 6 g, *agar bacteriologica* 1,8 g, dan (4) media *starter* dan fermentasi, dengan komposisi per 100 ml: NH_4NO_3 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, KH_2PO_4 0,2 g, sukrosa 1 g, minyak goreng sawit 1g, (5) bahan-bahan untuk analisis meliputi: larutan *buffer* fosfat (pH 6,5, 7, dan 7,5), larutan aseton-alkohol (1:1) teknis, larutan KOH alkoholis 0,05 N, dan indikator *phenolphthalein* (pp). Bahan-bahan untuk analisis kadar protein dengan metode Lowry meliputi: larutan protein, aquades, reagen Lowry A, reagen Lowry B, kristal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan larutan *buffer* asetat pH 5,0.

Alat. Produksi enzim dilakukan dalam sebuah fermentor berupa tangki berpengaduk yang bervolume 2 liter. Uji karakterisasi enzim dilakukan dengan menggunakan motor pengaduk magnetik berpemanas, sedangkan *centrifuge Micro High Speed Refrigerated Centrifuge* VS-15000 CFN II digunakan untuk proses isolasi enzim.

Fermentasi. Proses fermentasi atau produksi enzim lipase diawali dengan menyiapkan media fermentasi sebanyak 1,4 liter yang sudah mengandung 3% b/v induser minyak goreng sawit. Campuran ini dimasukkan ke dalam fermentor, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama ± 15 menit. Setelah dingin, cairan fermentasi diatur pada pH netral (pH = 7) dengan larutan NaOH 50%. Media *starter* sebanyak 10% (dari volume kerja fermentor) diinokulasikan secara aseptik ke dalam fermentor, dan saat inokulasi ini dihitung

sebagai waktu ke-0 fermentasi. Fermentasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam dengan laju putaran pengadukan 250 rpm dan laju aerasi 1 vvm. Pengambilan sampel dilakukan setiap interval waktu 4 jam. Selanjutnya sampel dianalisis aktivitas enzim lipase menggunakan metode Lindfield dkk (1984) dan berat kering selnya menggunakan metode gravimetri.

Karakterisasi Enzim. Aktivitas enzim lipase menyatakan jumlah enzim yang mampu menghidrolisis sejumlah lemak dan minyak dalam satu satuan waktu. Satu unit lipase per ml (U/ml) menyatakan banyaknya enzim lipase yang dapat melepaskan 1 μmol asam lemak bebas per menit.

Analisis Aktivitas Enzim Lipase menggunakan Metode Lindfield, dkk. (1984). Sebanyak 2 gram minyak goreng sawit ditimbang dalam labu Erlenmeyer 150 ml. Setelah itu tambahkan 1 ml larutan enzim encer hasil fermentasi yang telah disaring dan 4 ml larutan *buffer* fosfat 0,05 M, pH 7,5. Campuran diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Selanjutnya, tambahkan 10 ml aseton-alkohol (1:1) dan aduk hingga homogen. Tambahkan 2-3 tetes indikator pp (*phenolphthalein*) pada larutan yang telah diaduk. Titrasi dengan menggunakan KOH alkoholis 0,05 N. Hentikan titrasi pada saat warna larutan menjadi merah jambu dan tidak hilang, catat volume titrasinya. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama dengan sampel, tetapi larutan aseton-alkohol (1:1) ditambahkan pada jam ke-0, sebelum diaduk, untuk mematikan enzim. Aktivitas enzim lipase dapat dihitung dengan cara sbb:

$$\text{aktivitas lipase (U/ml)} = \frac{(A - B) \times N \text{ KOH} \times 1000}{60}$$

dengan: A \equiv ml KOH untuk titrasi sampel, B \equiv ml KOH untuk titrasi blanko, 1000 \equiv konversi dari mmol ke μmol , dan 60 \equiv waktu reaksi (1 jam = 60 menit).

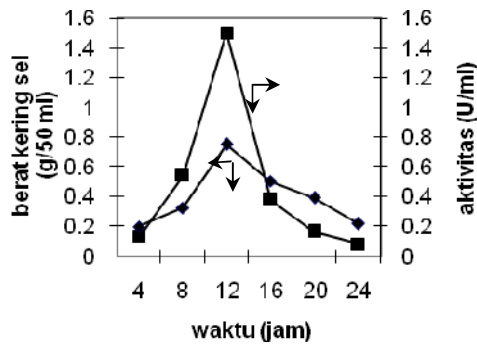
Isolasi Enzim. Hasil fermentasi dipisahkan antara cairan dan *cake*-nya. Cairan hasil pemisahan dipekatkan menggunakan amonium sulfat hingga kejenuhan 90%, kemudian didinginkan sampai suhu di bawah 10°C . Selanjutnya disentrifugasi dengan laju putaran 15000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Endapan yang diperoleh dikumpulkan, diuji aktivitas lipasenya, dan diuji kandungan proteinnya menggunakan metode Lowry (Sudarmadji, 1984).

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan dan perkembangbiakan sel jamur *Aspergillus niger* dalam proses fermentasi untuk memproduksi enzim dengan aktivitas enzim tertinggi sangat ditentukan oleh lamanya waktu fermentasi dan beberapa faktor seperti: laju aerasi, konsentrasi induser (minyak goreng sawit),

kecepatan pengadukan, dan pH awal. Kinerja enzim lipase dipengaruhi oleh pH dan suhu operasi.

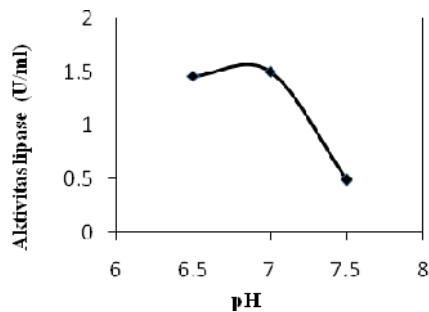
Pertumbuhan dan Produksi Enzim Lipase. *Aspergillus niger* mengalami pertumbuhan dan perkembangbiakan sel dalam memproduksi enzim lipase hingga mencapai puncaknya pada suatu waktu tertentu dan setelah itu pertumbuhannya akan mengalami penurunan. Dari Gambar 1, dapat dilihat bahwa produksi enzim lipase dari *Aspergillus niger* mengikuti pola *growth-associated product formation*. Hal ini disebabkan karena produksi enzim berfungsi mendukung pertumbuhan sel. Enzim mulai dihasilkan pada saat awal pertumbuhan sel. Penurunan pertumbuhan *Aspergillus niger* ditandai dengan turunnya berat kering sel yang diikuti dengan penurunan aktivitas enzim lipase.



Gambar 1. Profil Berat Kering Sel serta Aktivitas Enzim

Tabel 1. Nilai Aktivitas Enzim Lipase pada berbagai pH Pengujian dan Suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$

pH pengujian					
pH 6,5		pH 7		pH 7,5	
Jam ke-	U/ml	Jam ke-	U/ml	Jam ke-	U/ml
4	0,33	4	0,12	4	0,12
8	0,58	8	0,54	8	0,25
12	1,46	12	1,50	12	0,49
16	0,46	16	0,37	16	0,17
20	-	20	0,17	20	-
24	0,17	24	0,08	24	0,08

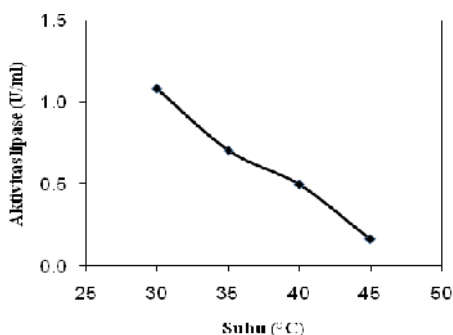


Gambar 2. Pengaruh pH Pengujian terhadap Aktivitas Enzim Lipase (Suhu 30°C , Fermentasi 12 jam)

Karakterisasi Kinetik Enzim Lipase Hasil Produksi. Enzim lipase hasil produksi dikarakterisasi dengan variabel pH dan suhu. Karakterisasi enzim lipase dilakukan setelah jamur *Aspergillus niger* difermentasi dalam fermentor selama 20 sampai 24 jam dengan interval waktu pengambilan sampel setiap 4 jam sekali. Pengaruh pH pengujian terhadap aktivitas enzim lipase disajikan pada Tabel 1. Pada tiap run diperoleh kondisi pH optimum pada uji aktivitas enzim lipase dicapai pada pH 7 (netral). Pada pH tinggi atau rendah memungkinkan terjadinya denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Karena enzim merupakan protein, perubahan pH akan menyebabkan ionisasi pada molekul protein berubah pula. Perubahan ini akan mengakibatkan struktur tiga dimensinya berubah sehingga fungsi katalitiknya terganggu. Terlihat pada Gambar 2, ada rentang pH yang dapat menyebabkan aktivitas lipase tertinggi, dan pH inilah yang dinamakan dengan pH optimum. Besarnya pH optimum yang sama, yaitu pH = 7, dilaporkan untuk lipase dari *Calvatia gigantea* (Christakopoulos, 1992).

Pengaruh suhu pengujian terhadap aktivitas enzim disajikan pada Tabel 2. Terlihat bahwa aktivitas lipase tertinggi dicapai pada suhu 30°C . Hasil ini sama dengan yang diperoleh untuk *Calvatia gigantea* (Christakopoulos, 1992). Tabel 2 menginformasikan bahwa aktivitas lipase semakin menurun seiring dengan kenaikan suhu. Pencapaian aktivitas lipase terendah berada pada suhu 45°C , yang merupakan suhu tertinggi pada percobaan ini. Hal ini dikarenakan enzim lipase mengalami kerusakan pada suhu yang lebih tinggi. Enzim merupakan protein, maka suhu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein, yaitu kerusakan pada struktur sekunder protein. Struktur sekunder protein berupa ikatan hidrogen yang terbentuk dari

ujung-ujung polar dari suatu rantai protein. Kerusakan struktur sekunder menyebabkan struktur tiga dimensi protein berubah. Perubahan ini menyebabkan terganggunya fungsi protein sebagai katalis, di mana kerja suatu enzim dianalogikan sebagai gembok dan kunci. Apabila struktur tiga dimensi berubah tentunya gembok dan kunci tidak cocok lagi, atau dengan kata lain aktivitas katalitik enzim terganggu. Pengaruh suhu terhadap aktivitas lipase juga dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, terlihat bahwa enzim lipase mampu menunjukkan kinerjanya secara optimum pada pH 7 dan suhu 30°C.



Gambar 3. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Lipase (pH 7, Fermentasi 12 jam)

Isolasi Enzim Lipase. Isolasi enzim lipase dilakukan untuk memekatkan lipase dari cairan hasil fermentasi. Isolasi ini dilakukan setelah proses fermentasi *A.niger* selama 12 jam, karena pada jam ke-12 jamur *A.niger* menghasilkan lipase dengan aktivitas tertinggi, sesuai dengan hasil pada percobaan sebelumnya. Hasil isolasi enzim lipase pada Tabel 3 menunjukkan bahwa konsentrasi protein meningkat setelah enzim encer dipekatkan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hingga kejenuhan 90%. Amonium sulfat merupakan garam yang sangat larut. Kenaikan konsentrasi amonium sulfat menyebabkan enzim keluar dari larutan membentuk endapan, dan proses ini disebut dengan *salting out*. Meningkatnya konsentrasi protein diikuti dengan meningkatnya aktivitas lipase dari 0,9167 U/ml menjadi 4 U/ml, atau peningkatan lebih dari 4 kali lipat. Peningkatan aktivitas tersebut disebabkan oleh konsentrasi protein tiap ml mengalami kenaikan setelah dipekatkan, namun kenaikan aktivitas enzim tidak diikuti oleh total protein yang diperoleh. Penurunan total protein ini dimungkinkan karena tidak semua protein yang terdapat dalam cairan enzim encer dapat terambil. Meskipun aktivitas lipase per ml mengalami peningkatan cukup signifikan, namun karena protein pada saat setelah dipekatkan tidak dapat terambil seluruhnya sehingga diperoleh *yield* aktivitas lipase sebesar 74,18%.

Tabel 2. Nilai Aktivitas Enzim Lipase pada Berbagai Suhu Pengujian dan pH 7

Jam ke-	Aktivitas enzim (U/ml)			
	Suhu 30°C	Suhu 35°C	Suhu 40°C	Suhu 45°C
4	0,46	-	0,25	0,04
8	0,67	0,54	0,37	0,08
12	1,08	0,71	0,50	0,17
16	0,62	0,42	0,29	0,12
20	0,33	0,17	0,08	0,04

Tabel 3. Isolasi Enzim Lipase

Tahapan	Total volume (ml)	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Aktivitas lipase (U/ml)	Aktivitas lipase total (U)	Yield (%) aktivitas lipase)
Enzim lipase encer	100	0,52	52,4	0,92	91,67	100
Enzim lipase setelah dipekatkan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hingga 90%	17	2,56	43,47	4	68	74,18

Keterangan: *Yield* merupakan perbandingan antara aktivitas lipase total sebelum dipekatkan dengan aktivitas lipase total setelah dipekatkan, yang dinyatakan dalam persen.

Isolasi Enzim Lipase. Isolasi enzim lipase dilakukan untuk memekatkan lipase dari cairan hasil fermentasi. Isolasi ini dilakukan setelah proses fermentasi *A.niger* selama 12 jam, karena pada jam ke-12 jamur *A.niger* menghasilkan lipase dengan aktivitas tertinggi, sesuai dengan hasil pada percobaan sebelumnya. Hasil isolasi enzim lipase pada Tabel 3 menunjukkan bahwa konsentrasi

protein meningkat setelah enzim encer dipekatkan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hingga kejenuhan 90%. Amonium sulfat merupakan garam yang sangat larut. Kenaikan konsentrasi amonium sulfat menyebabkan enzim keluar dari larutan membentuk endapan, dan proses ini disebut dengan *salting out*. Meningkatnya konsentrasi protein diikuti dengan meningkatnya aktivitas

lipase dari 0,9167 U/ml menjadi 4 U/ml, atau peningkatan lebih dari 4 kali lipat. Peningkatan aktivitas tersebut disebabkan oleh konsentrasi protein tiap ml mengalami kenaikan setelah dipekatkan, namun kenaikan aktivitas enzim tidak diikuti oleh total protein yang diperoleh. Penurunan total protein ini dimungkinkan karena tidak semua protein yang terdapat dalam cairan enzim encer dapat terambil. Meskipun aktivitas lipase per ml mengalami peningkatan cukup signifikan, namun karena protein pada saat setelah dipekatkan tidak dapat terambil seluruhnya sehingga diperoleh *yield* aktivitas lipase sebesar 74,18%.

Kesimpulan

Enzim lipase dapat diproduksi oleh jamur *A.niger* dengan induser minyak goreng sawit melalui proses fermentasi. Karakterisasi kinetik enzim lipase yang dihasilkan menunjukkan aktivitas enzim tertinggi dicapai pada pH 7 dan suhu 30°C. Proses isolasi enzim menggunakan garam amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 90% menghasilkan peningkatan aktivitas enzim dari 0,9167 U/ml menjadi 4 U/ml.

Daftar Pustaka

- Belter, Paul A., E. L. Cussler, and Wei-Shou Hu, 1988, *Bioseparations Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York
- Benjamin, S. dan Ashok Pandey, 1996, *Optimization of Liquid Media for Lipase Production by Candida rugosa*, *Bioresource Technology*, 55: 167-170
- Christakopoulos, P., Constantina Tzia, Dimitris Kekos, and basil J. Macris, 1992, Production and characterization of extracellular lipase from Calvatia gigantea, *Appl Microbiol Biotechnol*, 132:194-197
- Darwis, A. Aziz, dan E. Sukara, 1990, *Isolasi, Purifikasi, dan Karakterisasi Enzim*, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Gandhi, N., 1997, *Application of Lipases*, *Journal American Oil Chemist Society*, 74(6), 621-629.
- Herawan, Tjahjono dan Eka Nuryanto, 1996, *Hidrolisis Minyak Sawit Menggunakan Lysozyme dari Mucor meihei*, *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*, 4(2), 91-95.
- Linfield, et.al., 1984, *Lipid-lipase Interaction I. Fat Splitting with Candida rugosa*, *JAOCS*, 61(6), 1067-1071
- Lehninger, Albert. L, 1990, *Dasar-dasar Biokimia*, Jilid 1, Erlangga, Jakarta
- Poedjiadi, Anna, 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, Universitas Indonesia Press, Jakarta
- Shahani, K. M. 1975, *Lipase and Esterases*, In *Enzymes in Food Processing* ed, G, Redd, pp.181-217. Academic, New York
- Sharon, C, S. Furugoh, T. Yamakido, H.I. Ogawa dan Y. Kato, 1998, Purification and Characterization of a lipase from Pseudomonas aeruginosa KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 304-307
- Sri Wahyu Murni, Siti Diyar Kholisoh, Renaldo A. N., dan Nurul Arifin S. S. , 2010, Produksi Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* dengan Induser Minyak Goreng Sawit, *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia*, Unpar, Bandung
- Stanbury, P. F, A. Whittaker. 1984, *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press, Oxford
- Sudarmadji, Slamet, dkk., 1984, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, 3^{ed}, Liberty, Yogyakarta
- Wang D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, and M. D. Lilly, 1979. *Fermentation & Enzyme Technology*, Wiley-Interscience, Canada